

# PROTÉOMIQUE PAR SELDI-TOF-MS DES MALADIES INFLAMMATOIRES ARTICULAIRES : identification des protéines S100 comme protéines d'intérêt

D. DE SENY (1), C. RIBBENS (2), G. COBRAVILLE (3), M.A. MEUWIS (4), R. MARÉE (5), P. GEURTS (6),  
L. WEHENKEL (7), E. LOUIS (8), M.P. MERVILLE (9), M. FILLET (10), M.G. MALAISE (11)

**RÉSUMÉ :** La protéomique clinique est une approche technologique qui, en étudiant l'ensemble des protéines exprimées, met l'accent sur une description dynamique de la régulation cellulaire en décelant des événements moléculaires associés au développement de maladies. Son but est d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques ou de nouvelles cibles thérapeutiques liées à ces pathologies. C'est une approche multidisciplinaire à la croisée des chemins entre la médecine, la biologie, la bioanalyse et la bioinformatique; et c'est grâce à une collaboration étroite entre les services experts dans ces domaines que plusieurs études protéomiques portant sur des maladies inflammatoires articulaires ont été menées sur le site du CHU et de l'Université de Liège avec GIGA-Research comme interface logistique et fonctionnelle. Le but poursuivi au travers de ces études est décrit dans cet article selon trois axes de recherche relatifs à l'identification de marqueurs sensibles et spécifiques d'une pathologie, d'un mécanisme biologique commun ou encore de la réponse au traitement qui lui est apportée. Ce travail a été présenté dans le cadre de la réunion Synthèse 2009.

**MOTS-CLÉS :** *Polyarthrite rhumatoïde - Protéomique - SELDI-TOF-MS*

**PROTEOMICS STUDIES ON ARTHRITIDIES BY SELDI-TOF-MS : IDENTIFICATION OF THE S100 PROTEINS FAMILY AS PROTEINS OF INTEREST**

**SUMMARY :** Clinical proteomics is a technical approach studying the entire proteome expressed by cells, tissues or organs. It describes the dynamics of cell regulation by detecting molecular events related to diseases development. Proteomic techniques focus mainly on identification of new biomarkers or new therapeutic targets. It is a multidisciplinary approach using medical, biological, bioanalytical and bioinformatics knowledges. A strong collaboration between these fields allowed SELDI-TOF-MS proteomics studies to be performed at the CHU and the University of Liège, in GIGA-Research facilities. The aim of these studies was driven along three main axes of research related to the identification of biomarkers specific to a studied pathology, to a common biological pathway and, finally, to a treatment response. This work was presented in the setting of the "Synthèse CHU 2009" meeting.

**KEYWORDS :** *Rheumatoid arthritis - Proteomics - SELDI-TOF-MS*

## INTRODUCTION

La protéomique, approche technologique en pleine expansion, étudie l'ensemble des protéines (protéome) exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe donné. Contrairement au génome, le protéome est en constante évolution afin de répondre au mieux aux nombreux stimuli environnementaux que reçoivent les cellules. La protéomique met l'ac-

cent sur une description dynamique de la régulation cellulaire et devient, dès lors, un outil permettant de déceler des événements moléculaires associés au développement de maladies. La protéomique clinique repose sur l'analyse d'échantillons biologiques prélevés chez des patients atteints d'une maladie bien caractérisée, telle que la polyarthrite rhumatoïde (PR), afin d'obtenir un profil protéique spécifique d'un état pathologique donné. Cette signature protéique, obtenue chez des patients dont l'état d'avancement de la maladie est similaire, peut ensuite être comparée à la signature protéique de sujets sains ou de patients se trouvant à un stade différent d'évolution de la maladie, ou encore à la signature de patients atteints par des pathologies proches, telle l'arthrite psoriasique (APs). La protéomique permet donc de comprendre les processus biologiques associés au développement d'une maladie et d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques ou de nouvelles cibles thérapeutiques liées à cette pathologie.

Si la protéomique par électrophorèse bidimensionnelle permet déjà depuis plusieurs années de cartographier l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique, son application reste toutefois limitée à l'ana-

(1) Chargée de Recherches, (3) Technologue, (11) Professeur Ordinaire, Université de Liège, Chef de Service, Service de Rhumatologie, CHU de Liège, et GIGA-Research (GIGA-I3).

(2) Chef de Clinique, Service de Rhumatologie, CHU de Liège.

(4) GIGA Management, Plateforme Protéomique, Université de Liège.

(5) GIGA Management, Plateforme Bioinformatique, Université de Liège.

(6) Chercheur qualifié FNRS, (7) Professeur Ordinaire, Département d'électricité, électronique et informatique, Université de Liège, et GIGA-Research (GIGA-SB).

(8) Maître de Recherches, FNRS, Service de Gastroentérologie, CHU de Liège, et GIGA-Research (GIGA-I3).

(9) Maître de Recherches FNRS, Service de Chimie médicale, CHU de Liège, et GIGA-Research (GIGA-I3).

(10) Chercheur qualifié FNRS, Service d'Analyse des médicaments, Bioanalyse, Institut de Pharmacie, Université de Liège, et GIGA-Research (GIGA-I3).

lyse simultanée d'un petit nombre d'échantillons. Le développement récent de la technique par spectrométrie de masse de type SELDI-TOF-MS offre, par contre, la possibilité d'investiguer rapidement une partie du protéome de plus d'une centaine d'échantillons biologiques. Elle est cependant limitée à l'analyse de protéines de petit poids moléculaire (<25 kDa) telles que les cytokines et produits de dégradation souvent rencontrés dans les maladies inflammatoires chroniques.

Techniquement, l'approche SELDI-TOF-MS (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) est basée sur l'interaction entre des protéines présentes dans un prélèvement (sanguin, tissulaire, ...), et des spots rassemblés sur une barrette dont la surface (hydrophobe, cationique, anionique, ...) réagit spécifiquement en fonction des propriétés physico-chimiques de la protéine (Fig. 1a) (1). Suite à plusieurs lavages de cette surface, les protéines retenues sont ensuite désorbées et ionisées sous l'action d'un laser pour être séparées en fonction de leur masse et de leur charge. Il en résulte un spectre de masse (ou profil protéique) propre au prélèvement donné où chaque pic correspond à une protéine ou à un peptide (Fig. 1b). Une représentation en «code barre» est également possible (Fig. 1b). Les profils protéiques

ainsi obtenus à partir d'échantillons de patients répartis en plusieurs groupes en fonction de leur pathologie ou de l'état d'avancement de la maladie sont ensuite comparés statistiquement par des logiciels informatiques adéquats afin d'identifier des marqueurs protéiques exprimés sous la forme  $m/z$  (masse/charge) et spécifiques de la maladie étudiée (2).

Dans notre recherche actuelle, trois objectifs sont poursuivis. Dans un premier temps, nous cherchons à identifier des marqueurs sériques les plus sensibles et les plus spécifiques d'une maladie telle que la PR, en comparant des profils protéiques provenant d'échantillons de patients atteints par cette pathologie ou par des maladies dont la physiopathologie est différente, tout en présentant les mêmes caractéristiques inflammatoires (APs, spondylarthrite ankylosante (SA) et maladies inflammatoires intestinales comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH)). Un deuxième objectif consiste en l'identification de marqueurs spécifiques d'un mécanisme physiopathologique donné, commun à des pathologies différentes (par exemple, une PR et une MC). Enfin, nous cherchons également à identifier des marqueurs prédictifs de la réponse à un traitement tel que les anti-TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*).

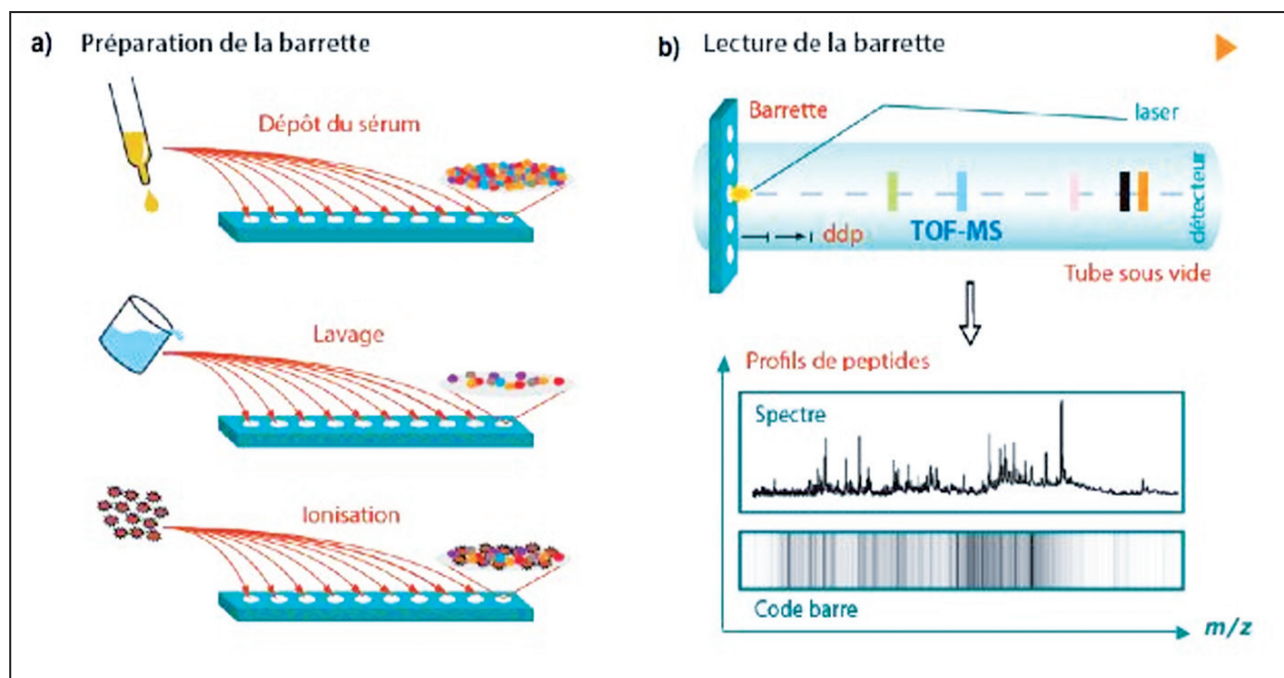


Figure 1. Préparation des barrettes et principe de lecture par spectrométrie de masse. L'échantillon biologique (sérum, urine, liquide céphalorachidien...) est déposé sur une barrette contenant plusieurs spots recouverts d'une surface chromatographique. Certaines protéines interagissent spécifiquement avec cette surface en fonction de leurs propriétés physico-chimiques alors que d'autres protéines non spécifiques sont éliminées par plusieurs lavages successifs. Les spots sont ensuite recouverts d'une molécule qui permet l'ionisation et la désorption par laser des peptides ou protéines retenus. Les ions ainsi produits sont soumis à une différence de potentiel (ddp) et séparés lors de leur temps de vol jusqu'au détecteur en fonction de leur masse et de leur charge ( $m/z$ ). On obtient ainsi une signature protéique (ou spectre) à l'image des peptides présents dans l'échantillon biologique analysé. Dans le spectre, chaque pic correspond à un peptide. Une représentation en «code barre» est également possible : chaque barre correspond alors à un peptide. (Figure publiée dans la lettre du FNRS, n°67, Décembre 2006).

# IDENTIFICATION DE MARQUEURS SÉRIQUES SENSIBLES ET SPÉCIFIQUES D'UNE PATHOLOGIE

Cherchant une ou des protéines spécifiques de la maladie PR, nous avons toujours comparé les profils protéiques d'échantillons prélevés chez des patients atteints de PR aux profils obtenus à partir d'autres maladies inflammatoires rhumatologiques comme l'APs et la SA, digestives comme la MC et la RCUH, et pulmonaire comme l'asthme, ou encore aux profils protéiques provenant de pathologie rhumatologique non inflammatoire comme l'arthrose, ou de sujets sains. Dans ces conditions très sévères de sélection des échantillons, nous ne sommes pas encore parvenus à proposer un biomarqueur spécifique de la PR. Dans l'état actuel des connaissances, les anticorps (Ac) dirigés contre les peptides citrulinés (*Cyclic Citrullinated Peptide* – CCP) (76% de sensibilité et 96% de spécificité) (3) restent les plus utiles en pratique clinique. Ils permettent d'identifier les PR de l'atteinte articulaire de la maladie idiopathique de Sjögren (4) ainsi que de la polyarthrite liée à l'hépatite B (5). Dans les formes de PR négative pour les Ac anti-CCP, d'autres Ac ont récemment été décrits, également dirigés contre une protéine citrulinée, la vimentine (Ac antiMCV – *Mutated Citrullinated Vimentin*) et présents dans 12% de cette cohorte (6). Il est donc probable qu'un réseau complexe de protéines spécifiques encore non identifiées existe. Une nouvelle protéine citrulinée fortement immunoréactive, la FUSE-BP (*Far Up-Stream Element-Binding Protein*) a été identifiée par spectrométrie de masse comme spécifique de la PR débutante (7) et son taux sérique est indépendant de celui des Ac anti-CCP, ce qui augmente encore son importance potentielle. L'article ne décrit cependant pas la composition exacte du groupe non-PR. La FUSE-BP est une protéine de trop haut poids moléculaire, environ 70 kDa, pour que nous l'ayons détectée par SELDI-TOF-MS.

# IDENTIFICATION DE MARQUEURS SÉRIQUES SENSIBLES ET SPÉCIFIQUES D'UN MÉCANISME BIOLOGIQUE COMMUN

## SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DONNÉES PAR DES PROFILS PROTÉIQUES

La première étude protéomique a été réalisée à partir de 34 échantillons sériques prélevés chez des patients atteints par une PR bien caractérisée (selon les critères de l'*American College of Rheumatology*) ainsi qu'à partir de 69 échantillons sériques provenant de personnes

saines ou de patients atteints d'arthrose, d'APs, d'asthme ou de MC. Le développement conjoint de logiciels informatiques par des approches multivariées (*Decision Tree Boosting*, *Bagging*, *Random Forests and Extra Trees*) (2) a permis d'opposer, d'une part, les signatures protéiques du groupe PR aux autres signatures protéiques, et, d'autre part, de comparer les signatures entre les deux pathologies proches, à savoir la PR et l'APs (8). Dans la première comparaison opposant les signatures PR vs non-PR, une sensibilité de 97% et une spécificité de 91% ont été calculées par l'approche statistique multivariée de type *Decision Tree Boosting*. Dans la comparaison opposant les deux pathologies proches, la sensibilité et la spécificité ont été estimées respectivement à 94% et 86% par cette même approche statistique. Lors de cette étude, un premier marqueur discriminant, spécifique de l'arthrite (PR et APs), a été identifié comme étant la protéine S100A8, connue aussi sous le nom de «Myeloid-Related Protein 8» (MRP8) ou calgranulin A.

## STATUT DES PROTÉINES S100 EN TANT QUE MARQUEURS DES MALADIES INFLAMMATOIRES ARTICULAIRES

Suite à la détection de cette protéine S100A8, une nouvelle étude comprenant un plus grand nombre d'échantillons sériques a été réalisée afin de mieux définir le statut de cette protéine ainsi que celui d'autres protéines S100 impliquées dans les maladies inflammatoires articulaires. En effet, au cours de ces dernières années, on a pu observer un intérêt grandissant à l'égard des protéines S100A8, S100A9 et S100A12 en tant que marqueurs de l'activation phagocytaire dans des maladies inflammatoires chroniques telles que la PR, l'APs ou l'arthrite juvénile idiopathique, ou encore dans la MC ou la RCUH (9-11). Ce sont des protéines de petit poids moléculaire composées de deux sites de fixation de l'ion calcium. Les protéines S100A8 et S100A9 sont exprimées dans les granulocytes, les monocytes et à un stade précoce de différenciation des macrophages, tandis que la protéine S100A12 est essentiellement exprimée par les granulocytes. Une des caractéristiques des protéines S100A8 et S100A9 est la présence d'un lien non covalent les regroupant sous la forme d'un hétérodimère (12). Le trimère S100A8/(S100A9)<sub>2</sub>, mieux connu sous le nom de calprotectine (36,5 kDa) n'a jamais été confirmé par aucune étude RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Cependant, le terme «calprotectine» reste communément utilisé en biologie clinique; elle est considérée comme un marqueur des maladies inflammatoires intestinales, dosable par ELISA dans les



matières fécales (13). D'autre part, il semblerait qu'en conditions inflammatoires, S100A8 et S100A9 soient produites indépendamment avec une expression unique de S100A9 dans des conditions d'inflammation aiguë telle la gingivite, alors que l'expression de S100A8 serait restreinte à l'inflammation chronique (14). Aucun ELISA commercialement accessible ne permet actuellement de détecter les formes S100A8 et S100A9 sous leur forme monomérique. De plus, l'utilisation d'anticorps reste toujours une approche difficile à entreprendre au risque d'obtenir différentes réactions croisées non spécifiques. La spectrométrie de masse de type SELDI-TOF-MS nous est donc apparue comme une approche de choix dans la détection de ces protéines par sa capacité à différencier les deux protéines en fonction de leur poids moléculaire et leur  $m/z$  différente.

Cent trente neuf échantillons sériques prélevés chez des patients atteints d'arthrose, de PR, d'APs, de SA, de MC, de RCUH ainsi que de personnes saines ont été analysés (15). Les trois protéines S100 recherchées ainsi que la protéine amyloïde A sérique (SAA) ont été détectées dans les profils protéiques de plusieurs échantillons de patients atteints de PR, APs ou SA en fonction

de leurs poids moléculaires (Fig. 2). Elles ont été considérées comme marqueurs de l'arthrite pour les protéines S100 ou marqueur de l'inflammation pour la SAA et, ce, par les analyses statistiques univariées et multivariées. Un variant de la protéine S100A9 (S100A9\*), résultant d'une translocation commençant à l'acide aminé 5 et une acétylation de l'acide aminé 6, a également été détecté, de même que deux autres formes tronquées de la SAA : SAA-des-Arg (SAA-R) et SAA-des-Arg/Ser (SAA-RS). Les 4 protéines S100 (S100A8, S100A9, S100A9\* et S100A12) ont également été détectées par la même méthodologie SELDI-TOF-MS dans le liquide synovial de patients atteints de PR.

L'intérêt de cette recherche réside essentiellement dans la mise au point d'une technique permettant de déterminer le statut des protéines S100A8 et S100A9 en tant que monomère ou forme tronquée ainsi que le statut des différents variants de la SAA. Même si l'hétérocomplexe S100A8/S100A9 semble jouer un rôle prépondérant par rapport à ses formes respectives monomériques (S100A8 et S100A9), certaines recherches semblent mettre en évidence un rôle distinct entre S100A8 et S100A9. En effet, van Lent et al. (2008) ont mis récemment en évi-

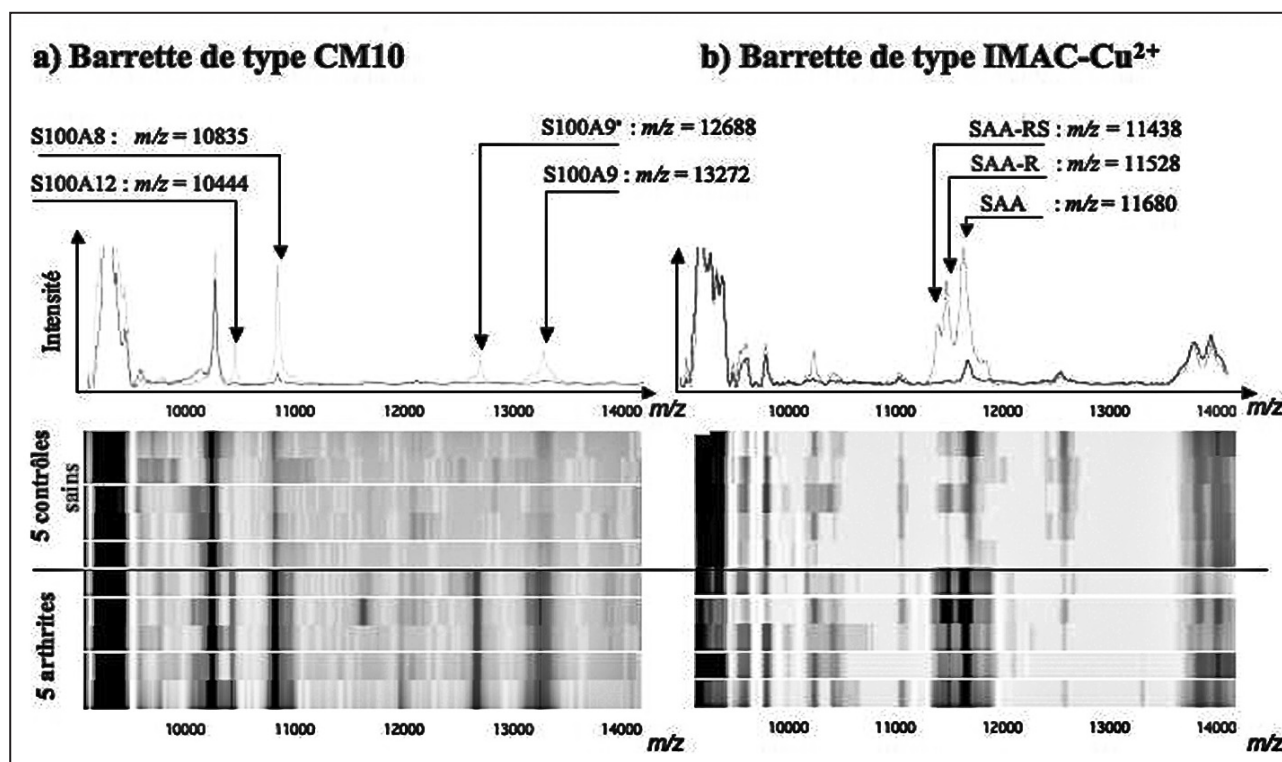


Figure 2. Profils protéiques obtenus sur deux types de surface chromatographique (CM10 et IMAC-Cu<sup>2+</sup>) à partir d'échantillons sériques provenant de 5 patients atteints de maladies non inflammatoires (dont l'arthrose) (trait noir sur le spectre) et 5 patients atteints d'arthrites (PR, APs ou spondylarthrite ankylosante) (trait gris sur le spectre). Une représentation en code barre est également présentée.

A. Détection des protéines S100A8, S100A9, S100A9\* et S100A12, marqueurs de l'arthrite sur CM10

B. Détection de la SAA et ses deux variants, marqueurs de l'inflammation, sur IMAC-Cu<sup>2+</sup>

(Figure publiée dans Clin. Chem. 2008 ; 54: 1066-1075 avec permission accordée par Clinical Chemistry).

dence le rôle joué par la protéine S100A8 dans la stimulation chondrocytaire d'un modèle expérimental de souris (16). Les glucocorticoïdes semblent augmenter l'expression de S100A8 par les macrophages de patients atteints de PR (17). S100A8 seule a été détectée dans l'inflammation intra-amniotique (18). Une étude menée par Liao et al. montre que la concentration des trois protéines S100 est plus élevée dans les PR érosives vs non érosives (19). Le rôle joué par S100A8, S100A9 ou S100A8/S100A9 pourrait donc varier en fonction de la présence ou non de certains facteurs liés à la pathologie ou au traitement. Enfin, le rôle joué par l'hétérocomplexe S100A8/S100A9 pourrait être différent de celui joué par les formes monomériques. Une prochaine étude protéomique devrait nous permettre de mieux clarifier le statut des protéines S100A8, S100A9 et S100A12 dans le développement de la PR, du processus inflammatoire en général, ainsi que dans la réponse au traitement.

Il est clair, qu'avant l'étude, nous pensions davantage détecter de multiples cytokines pro-inflammatoires plutôt que des protéines de la famille S100. Néanmoins, la découverte de ces nouveaux marqueurs de l'inflammation reste d'une grande pertinence physiopathologique. La figure 3 montre en effet que la sécrétion de S100A8, S100A9 et S100A12 par les phagocytes est soumise à une double régulation indépendante: un premier signal active la protéine kinase C (par le LPS ou par une cytokine) alors qu'un deuxième signal provoque l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium suite à un contact membranaire entre le phagocyte et une cellule endothéliale préalablement activée par le TNF $\alpha$ . Ces conditions d'activation très restrictives représentent l'initiation d'un processus inflammatoire chronique. Les molécules sécrétées se fixent sur des structures glucidiques de la membrane comme l'héparan-sulfate ou des glycans carboxylés, ou encore le récepteur reconnaissant les produits glyqués (RAGE) avec pour conséquence, l'activation du facteur nucléaire NF $\kappa$ B conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion (20).

#### IDENTIFICATION DE MARQUEURS PRÉDICTIFS DE LA RÉPONSE AU TRAITEMENT

Les thérapies à base d'anti-cytokines utilisées dans le traitement des maladies auto-immunes telles que la PR ou la MC sont actuellement en pleine expansion (21, 22). Plus de 300.000 patients à travers le monde sont aujourd'hui

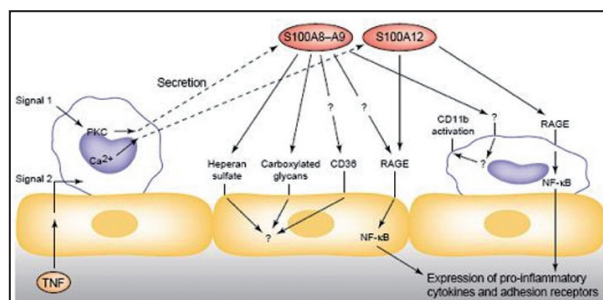


Figure 3. Sécrétion phagocytaire de S100A8, S100A9 et S100A12 suite à l'activation de la protéine kinase C par le LPS ou par une cytokine (signal 1) ainsi qu'à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium après contact membranaire entre le phagocyte et la cellule endothéliale préalablement activée par le TNF $\alpha$  (signal 2). Une fois sécrétée, les protéines S100 se fixent sur des structures glucidiques de la membrane comme l'héparan-sulfate ou des glycans carboxylés, ou encore le récepteur reconnaissant les produits glyqués (RAGE) avec pour conséquence l'activation du facteur nucléaire NF $\kappa$ B conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion. (Figure publiée dans *TRENDS in Immunology*, 2003, 24, 155-158, avec permission accordée par Elsevier).

traités par ces agents qui bloquent spécifiquement l'activité biologique du TNF $\alpha$ , réduisant ainsi considérablement l'activité de la maladie. Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans plusieurs pathologies chroniques dont la PR, l'APs, la SA et la MC. Cette cytokine intervient dans le recrutement de cellules inflammatoires conduisant à la production de nouvelles cytokines, amplifiant ainsi la réponse immunitaire. Le TNF $\alpha$  est une cible thérapeutique intéressante qui a rapidement conduit à l'élaboration de différents anticorps complexant le TNF $\alpha$  dont l'infliximab (Remicade®), l'etanercept (Enbrel®) et l'adalimumab (Humira®). Le blocage de cette cytokine a considérablement changé la thérapie des maladies inflammatoires chroniques, mais elle n'est efficace que pour environ deux tiers des patients. L'efficacité des anti-TNF $\alpha$  dans le traitement de la PR, de l'APs, de la SA et de la MC a été démontrée au travers de nombreuses études menées en phase III à court et à long termes (21, 23-25).

Afin d'adapter le traitement par anti-TNF $\alpha$  de façon plus adéquate aux patients atteints de PR ou de MC, de nouvelles études protéomiques par SELDI-TOF-MS ont été récemment réalisées dans le but de mettre en évidence un ou plusieurs marqueurs prédictifs de la réponse à l'infliximab (26, 27). Des biomarqueurs ont été identifiés dans la MC et la PR : la protéine PF4 (Platelet Factor 4) corrélée à une mauvaise réponse à l'infliximab dans la MC (26) et dans la PR (27) et l'apolipoprotéine A1, au contraire favorable à une réponse positive dans la PR (27). La finalité clinique de ces observations reste éloignée, mais ce n'est qu'une question

de temps. Des études complémentaires sont actuellement en cours de réalisation.

## CONCLUSION

La protéomique clinique est une approche multidisciplinaire faisant appel à des compétences dans des domaines aussi vastes que la médecine, la biologie, la bioanalyse ou la bioinformatique. Les études décrites ci-dessus ont pu être réalisées grâce à l'élaboration d'une banque d'échantillons sériques constituée par les services cliniques, grâce au développement technique des approches protéomiques par plusieurs chercheurs du GIGA-Research ainsi qu'à l'élaboration de logiciels informatiques adaptés à l'ensemble des données générées par le SELDI-TOF-MS par l'Unité de Systèmes et Modélisation du Professeur Louis Wehenkel de l'Institut Montéfiore. Chacun apporte son expertise fondamentale. Que vaudraient la sensibilité et la spécificité d'un biomarqueur s'il n'était pas identifié sur des cohortes rigoureusement sélectionnées par des cliniciens avertis ? Quelle valeur donner à un pic identifié s'il ne provenait de résultats obtenus à partir de machines réglées comme des montres suisses par des experts en spectrométrie de masse et en biochimie des protéines ? Et comment pourrions-nous analyser les résultats obtenus, les synthétiser en termes de pertinence statistique diagnostique et les retourner vers le clinicien si nous n'avions pas accès aux logiciels bioinformatiques développés par nos ingénieurs les plus performants ? C'est là toute la richesse de la recherche translationnelle déjà bien établie entre le CHU et GIGA-Research. Même s'il est encore aujourd'hui difficile de valider des profils protéiques entiers dans un but diagnostique, il est cependant possible d'identifier des protéines spécifiques d'un mécanisme biologique donné et de leur attribuer une fonction dépendante de stimuli biologiques, d'une évolution pathologique ou d'un traitement. Il est clair que la synovite rhumatoïde est la résultante de l'action d'une pléiade de cytokines dont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF $\alpha$ , qui sont des acteurs bien connus, et leur nombre ne cesse d'augmenter d'année en année (IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33) (28). Personne ne sait quelle est la contribution respective de chacune d'entre elles et dans quelles séquences se déroulent leurs interactions. Enfin, quel traitement biologique choisir et dans quel ordre ? La protéomique, par son absence d'*a priori*, nous renvoie l'image de tout ce qui se passe à un moment donné. En choisissant de manière adéquate les contrôles négatifs et les contrôles positifs, il est maintenant possi-

ble, avec l'aide de la bioinformatique, d'identifier des profils protéiques ou des protéines spécifiques d'une pathologie, d'un mécanisme ou d'une réponse thérapeutique. La surprise est souvent au rendez-vous et des protéines connues se voient attribuer potentiellement de nouvelles fonctions jusqu'ici inconnues. C'est le cas des protéines S100, de PF4 et de l'apolipoprotéine A1. Des protéines inconnues, comme les variants, peuvent aussi émerger. Certes, la protéomique est encore à l'aube de son développement, mais l'avenir devrait nous donner raison quant à son utilisation.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR.— Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev*, 2004, **23**, 34-44.
2. Geurts P, Fillet M, de Seny D, et al.— Proteomic mass spectra classification using decision tree based ensemble methods. *Bioinformatics*, 2005, **21**, 3138-3145.
3. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, et al.— Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*, 1998, **101**, 273-281.
4. Kamali S, Polat NG, Kasapoglu E, et al.— Anti-CCP and antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis, primary Sjogren's syndrome, and Wegener's granulomatosis. *Clin Rheumatol*, 2005, **24**, 673-676.
5. Lim MK, Sheen DH, Lee YJ, et al.— Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies distinguish hepatitis B virus (HBV)-associated arthropathy from concomitant rheumatoid arthritis in patients with chronic HBV infection. *J Rheumatol*, 2009, **36**, 712-716.
6. Nicaise Roland P, Grootenboer Mignot S, Bruns A, et al.— Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy. *Arthritis Res Ther*, 2008, **10**, R142.
7. Goeb V, Thomas-L'Otellier M, Daveau R, et al.— Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Res Ther*, 2009, **11**, R38.
8. de Seny D\*, Fillet M\*, Meuwis MA, et al. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. \*Equally contributed to the work. *Arthritis Rheum*, 2005, **52**, 3801-3812.
9. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J.— S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*, 2007, **81**, 28-37.
10. Frosch M, Vogl T, Seeliger S, et al.— Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, **48**, 2622-2626.
11. Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, et al.— Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, **48**, 1676-1685.

12. Propper C, Huang X, Roth J, et al.— Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation. *J Biol Chem*, 1999, **274**, 183-188.
13. Fagerberg UL, Loof L, Lindholm J, et al.— Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007, **45**, 414-420.
14. Zwadlo G, Bruggen J, Gerhards G, et al.— Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol*, 1988, **72**, 510-515.
15. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, et al.— Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem*, 2008, **54**, 1066-1075.
16. van Lent PL, Grevers LC, Blom AB, et al.— Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, **58**, 3776-3787.
17. Hsu K, Passey RJ, Endoh Y, et al.— Regulation of S100A8 by glucocorticoids. *J Immunol*, 2005, **174**, 2318-2326.
18. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Weiner CP, et al.— Proteomic but not enzyme-linked immunosorbent assay technology detects amniotic fluid monomeric calgranulins from their complexed calprotectin form. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, **12**, 837-844.
19. Liao H, Wu J, Kuhn E, et al.— Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004, **50**, 3792-3803.
20. Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C.— Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol*, 2003, **24**, 155-158.
21. von Freyckell C, Henno A, de la Brassinne M, Malaise MG.— Le traitement biologique des maladies inflammatoires à médiation immune. *Rev Med Liege*, 2007, **62**, 55-62.
22. von Freyckell C, Malaise MG.— Traitements biologiques en rhumatologie. Biological therapies in rheumatology. *Rev Med Liege*, 2009, **64**, 293-300.
23. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al.— Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*, 2002, **359**, 1541-1549.
24. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, et al.— Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate : a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*, 1999, **354**, 1932-1939.
25. Reenaers C, Louis E, Belaiche J.— Thérapies biologiques et maladies inflammatoires chroniques intestinales. Biologic therapies in chronic inflammatory bowel diseases. *Rev Med Liege*, 2009, **64**, 301-304.
26. Meuwis MA, Fillet M, Lutterli L, et al.— Proteomics for prediction and characterization of response to infliximab in Crohn's disease: a pilot study. *Clin Biochem*, 2008, **41**, 960-967.
27. Trocme C, Marotte H, Baillet A, et al.— Apolipoprotein A-I and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2009, **68**, 1328-1333.
28. Brennan FM, McInnes IB.— Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 2008, **118**, 3537-3545.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr D. de Seny, Chargé de Recherches, Service de Rhumatologie, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.  
Email : ddeseny@chu.ulg.ac.be